# Sobre la estructura del mesénteron y sus apéndices tubuliformes en los Fásmidos

POR

F. Bonet

(Láms. I-III.)

Hace bastante tiempo (1927) encontré en el intestino medio de los Fásmidos unas vesículas piriformes de apariencia glandular y terminadas por un largo filamento semejante a los tubos de Malpighi; estas formaciones me llamaron poderosamente la atención por el hecho de que las células vesiculares poseen un núcleo ramificado semejante al que se encuentra en las glándulas sericígenas de los Lepidópteros. Consultando la bibliografía pude comprobar que mientras los apéndices piriformes habían sido observados ya de muy antiguo, nada se ha mencionado sobre esta particularidad del núcleo. Con tal motivo determiné estudiar la fina estructura de los apéndices en cuestión y de la porción del intestino en la que van insertos, empleando para ello los métodos argénticos que tan excelentes resultados han proporcionado en manos de la escuela española aplicados a otros grupos del reino animal.

Por lo que respecta a los artrópodos, mucho se puede esperar de ellos, sobre todo cuando sean obviadas ciertas dificultades técnicas derivadas de la especial constitución de estos animales, tales como presencia de quitina, necesidad de incluir, bien sea en gelatina o en otro medio más adecuado. Las mismas apetencias tinctoriales parecen ser algo distintas de las que poseen los tejidos de otros animales, y por tanto es necesario ensayar diversas variantes de estos métodos más o menos modificadas a este objeto.

## Técnica.

Como material de estudio se ha empleado el *Carausius morosus* Brunn., especie propia de la India, pero mantenida en cautividad desde hace varios años en este laboratorio.

Como métodos de control se han utilizado desde luego las técnicas clásicas al hemalumbre de Mayer con tinción complementaria por la eosina, picrofuchsina de Van Giesson, picroíndigocarmín de Cajal, etc. Asimismo hemos teñido con la hematoxilina férrica de Heindenhein previa inclusión en celoidina o parafina. El método de Dominici al naranja G-eosina-azul de toluidina, nos ha proporcionado también imágenes muy demostrativas.

Para darse perfecta cuenta de la conformación general de los apéndices tubuliformes, de sus relaciones con los manojos musculares del intestino y, sobre todo, para observar la estructura de los núcleos ramificados de las células ampulares, es preciso la confección de preparaciones totales de estos órganos. Para obtenerlas, después de tratar por los fijadores usuales la mitad posterior del intestino medio, que es donde se insertan estos apéndices, se procede a cortar longitudinalmente el intestino siguiendo una generatriz; los bordes del corte se rebaten sobre un plano y se extrae el contenido intestinal, operación sumamente fácil por ir envuelto en la membrana peritrófica. A continuación se colorean estos trozos de intestino por el método que se prefiera, procediendo en todo como si se tratase de cortes. Después de teñidos se extienden sobre un portaobjetos, procurando queden adheridos por su cara externa. Con ayuda del microscopio binocular y empleando agujas de disección, se desprende con cuidado el epitelio intestinal, quedando libre de este modo la túnica conjuntivomuscular, a la que quedan adheridos los apéndices tubuliformes. Se lava la pieza en agua abundante y se procede a la deshidratación, aclaramiento y montaje según costumbre.

El conocido método al carbonato de plata de Río-Hortega, bien empleado en frío o en caliente, nos ha proporcionado magníficas coloraciones nucleares y plasmáticas. La modificación del mismo utilizada por su autor para la tinción de epiteliofibrillas [1] nos ha permitido poner de manifiesto hasta en sus últimas ramificaciones una red conjuntiva sumamente tupida que envuelve los elementos de la túnica muscular del intestino. Esta técnica, tal como la hemos utilizado nosotros, es como sigue:

[1] . P. del Río-Hortega: «Manera sencilla de teñir epiteliofibrillas y ciertos retículos protoplasmáticos de difícil demostración». *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.*, t. XXVI, núm. 2, 1926.

1.° Fijación en formol al 20 por 100.

2.° Cortes por congelación previa inclusión en gelatina.

3.° Lavado en agua.

4.° Coloración en carbonato argéntico piridinado (unas IV o V gotas de piridina en 10 c. c. de solución argéntica), calentando hasta formación de abundante precipitado.

5.° Reducción en formol al 1 por 100.

6.° Lavado abundante en agua.

7.° Diferenciación y viraje en cloruro de oro amarillo al 1 por 500. En este baño se refuerza el colorido de las fibras conjuntivas, mientras que el resto de los elementos palidece extraordinariamente y toma color amarillento.

8.° Fijación en hiposulfito sódico, lavado y montaje en líquido de Faure sin deshidratación previa.

Eventualmente, y si los cortes resultasen demasiado coloreados por la plata, puede rebajarse la impregnación por medio de una solución de cianuro potásico al 0,5 por 1.000, según recomienda Berg [1], siempre y cuando se utilice antes del virado en oro. La diferenciación en cloruro de oro es imprescindible, pues gracias a ella resulta esta técnica extraordinariamente selectiva para las fibras conjuntivas en estos animales, pues los restantes elementos del tejido palidecen extraordinariamente; es más, he podido observar que a veces se tiñe este retículo parcialmente empleando el carbonato de plata en caliente sin piridina, pero esto únicamente en los cortes virados al oro, pues en los demás no he encontrado trazas de él.

Los métodos al carbonato argéntico, como en general los basados en impregnaciones argénticas, exigen, para obtener de ellos todo lo que son capaces de dar, la obtención de cortes con el micrótomo de congelación. La pequeñez de los objetos aquí estudiados y su contextura han hecho imprescindible la inclusión previa en gelatina; he empleado a este fin el método de Gaskell-Gräff, que me ha dado excelentes resultados. Pero es el caso que los cortes así obtenidos se retraen enormemente en las manipulaciones ulteriores, sobre todo al ser deshidratados y aclarados por los alcoholes. Esta retracción puede

[1] W. Berg: «Ueber eine Modifikation der Silberimprägnation des Bindegewebes nach Bielschowsky-Maresch». *Zeitschrift f. wisensch. Mikroskopie u. f. mikr. Technik,* Bd. 38, 1921.

malograr las coloraciones mejor obtenidas, sobre todo cuando el corte lleva mucha gelatina y no se evita en ocasiones ni aun empleando la mezcla deshidratante a la creosota (Río-Hortega), según preconiza Costero en un trabajo reciente [1]. Para evitar la deshidratación se han utilizado la glicerina y gelatina glicerinada, pero estos medios presentan los inconvenientes de todos conocidos, de los cuales no es el menor su bajo índice de refracción. El único vehículo que me ha dado resultados satisfactorios es el líquido de Faure (también llamado de Hoyer), empleado desde hace bastante tiempo en Entomología y cuya composición puede verse en el trabajo de Mercet [2] o en el mío sobre Colémbolos cavernícolas [3]. Su índice de refracción es próximo al del bálsamo del Canadá, y las preparaciones no necesitan ser bordeadas, pues se desecan por los bordes lo mismo que el bálsamo o la resina Dammar. Con él no se retraen los cortes, y las impregnaciones argénticas se conservan indefinidamente al parecer. Las efectuadas por mí se conservan desde hace más de nueve meses lo mismo que el primer día. No obstante, algunas de ellas han sufrido una especie de decoloración bastante pronunciada, pero hay que tener en cuenta que todos estos cortes fueron tratados con CNK, y atribuyo la decoloración a la presencia de restos de este potente disolvente de la plata como consecuencia de lavados imperfectos.

## Células epiteliales del intestino medio.

No es nuestro propósito dar una descripción detallada del epitelio intestinal del mesénteron, pues ha sido estudiado en diversos insectos por multitud de autores. Así, desde los trabajos de Henle y Kölliker, aparecidos respectivamente en 1837 y 1856, hasta los recientes de Lecaillon, Giard, Portes, Deegener, etc., pasando por los de Bizzozero, Frenzel, Heindenhein, Van Geuchten, Vignon y otros, son legión los que se han ocupado en esta cuestión tan debatida. En los mismos Fásmidos ha sido estudiado el epitelio intestinal por Heymons (1897) y Sinéty (1901). No obstante, no reina la unanimidad, ni mucho menos,

[1] Véase Costero: *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.*, t. XXXI, núm. 2, 1931.

[2] Véase Mercet: «Los Afelininos». *Trab. Mus. Nac. Cienc. Nat.*, Ser. Zool., núm. 6, 1912.

[3] *Mem. Soc. Esp. Hist. Nat.*, t. XIV, núm. 4, 1931.

en las interpretaciones que se han dado de la orla en cepillo o rhabdorium, lo que induce a pensar que el asunto dista mucho de estar perfectamente esclarecido. Por esto hemos considerado oportuno consignar aquí, y como de pasada, los datos que hemos obtenido a este respecto por juzgarlos de interés por si en su día sirven para esclarecer algo el asunto.

El epitelio intestinal está formado, como de ordinario, por células prismáticas dispuestas en estrato único, y sus núcleos yacen aproximadamente al mismo nivel, aunque éste puede variar algo en las distintas fases de secreción por las que atraviesan las células. Estas son siempre mucho más altas que anchas y su contorno poligonal, por presión recíproca, como puede observarse perfectamente en los cortes tangenciales.

El núcleo de estas células es voluminoso, casi esférico y muy rico en cromatina. Durante el período de secreción presenta un aspecto muy característico y sumamente constante en las preparaciones por mí observadas. La cromatina se acumula en casi su totalidad hacia la región del núcleo que da frente al polo secretor de la célula, es decir, en la porción que mira a la luz del tubo intestinal; a este nivel, parece como si cediera la membrana nuclear a la presión del acúmulo de cromatina, formándose una especie de saliente que da al núcleo un contorno oval. El resto del núcleo es muy claro, y en él se observan muy escasos gránulos cromáticos (lám. I, figs. *A* y *B*). Entiéndase bien que este aspecto se encuentra en las células libradas a un intenso trabajo secretor, es decir, mientras elaboran las substancias que después han de ser eliminadas al exterior, conservando todavía la orla bacilar intacta. En cambio, cuando entran en la fase de reposo, o mejor, de reconstrucción, la cromatina se esparce por toda la extensión del núcleo, apareciendo entonces éste de forma esférica o elíptica, pudiendo observarse bien los grumos de cromatina y uno o dos voluminosos nucléolos cromatínicos (lám. I, fig. *C*).

El protoplasma de estas células es intensamente basófilo, pues retiene bastante las anilinas básicas, hematoxilinas y plata coloidal. Es finamente granuloso, y los gránulos se alínean siguiendo direcciones paralelas al eje de la célula, resultando de esto una apariencia de estriación algo imprecisa, pero perfectamente observable. La substancia basófila no está distribuída uniformemente sobre el soma celular,

sino que se acumula de preferencia hacia el polo excretor, quedando la base bastante clara; la cantidad de esta substancia varía de unas células a otras, probablemente en relación con el estado funcional de cada una de ellas.

La formación más característica de estas células y también la más discutida es la orla bacilar o *rhabdorium*. En efecto, ha sido denominada, sucesivamente, placa ciliada, chapa estriada, orla en cepillo, placa en bastones, cutícula porosa, etc., y lo peor es que no se trata de una simple cuestión glosológica, sino que, como ocurre a menudo, en cada uno de estos nombres va implícita una concepción diferente de las estructuras observadas. El asunto es importante, pues, como se sabe, uno de los caracteres fundamentales para la caracterización del tipo Artrópodos reside precisamente en la ausencia de cilios vibrátiles. Esto parece ser hoy día un hecho completamente establecido si se exceptúan los Onicóforos. Unicamente se han descrito células ciliadas dotadas de movimiento vibrátil en el intestino de *Chironomus* por Vignon, pero esta observación no ha sido comprobada posteriormente. Por lo que a los Fásmidos se refiere, Sinéty, por observaciones «in vivo», concluye que los cilios de las células intestinales son inmóviles; yo he podido confirmarlo estudiando las células intestinales, así como las de los tubos de Malpighi y apéndices filiformes en solución fisiológica de ClNa al 8 por 1000. Con objeto de no confundir estas formaciones con los verdaderos cilios vibrátiles, adopto, siguiendo a Deegener, la denominación de orla bacilar, o mejor rabdorio.

Durante la fase de elaboración del material segregado la orla bacilar aparece íntegra como una formación completamente diferenciada del resto del citoplasma. Está formada por una multitud de bastoncitos cilíndricos sumamente finos y muy largos, adosados unos a otros y dispuestos paralelamente al eje de la célula; parecen ser continuación de las trabéculas longitudinales del citoplasma somático a que antes hemos hecho referencia, y todos ellos nacen y terminan al mismo nivel. El conjunto de estos bastoncitos constituye una placa perfectamente delimitada y que se distingue muy bien del resto del citoplasma por poseer una acidofilia intensa, mientras que, como ya hemos dicho, la porción distal del soma celular es fuertemente basófila. Así es que en las preparaciones teñidas con hematoxilina férrica y Van Giesson se aprecia a débiles aumentos que el epitelio intestinal

está bordeado por una banda clara que ofrece el aspecto de una cutícula gruesa.

No obstante, no existe una delimitación neta entre los bastones y el resto del citoplasma, pues no he podido encontrar membrana ni cutícula alguna a este nivel, viniendo a ser los bastones una diferenciación del citoplasma periférico en lugar de una dependencia de la membrana celular. La hematoxilina de Heindenhein tiñe unos corpúsculos basales sumamente pequeños y no siempre claramente delimitados, formando por su acumulación al mismo nivel una línea obscura en la base de implantación de los bastones. No he podido encontrar rizoplastos.

Los bastones de la placa están aglutinados entre sí por una substancia bastante flúida, por lo que presentan el aspecto de una chapa estriada. En realidad, la coalescencia de los bastoncitos es muy débil, pues al comienzo de la secreción pueden encontrarse pequeños glóbulos de la substancia segregada atravesando el espesor de la placa y apartando a su paso los bastones que la constituyen (lám. I, fig. *A*). Además se advierte con alguna frecuencia que los bastones no siempre conservan su paralelismo, sino que dentro de una misma placa puede haber varios de ellos más o menos flexuosos, y otros que sin serlo llevan una dirección oblicua, entrecruzándose más o menos con sus vecinos. Cuando una partícula alimenticia se introduce entre los elementos de la placa, puede verse cómo se separan éstos formando mechones, que se asemejan al aspecto que presentan los pelos de un pincel o brocha mojado en un líquido.

Cuando la célula comienza a verter su contenido en la cavidad intestinal el aspecto de la orla bacilar cambia por completo. Al principio pueden verse, como ya hemos dicho, pequeños glóbulos de secreción entre sus elementos; más adelante va cargándose de substancia basófila, los bastoncitos pierden su individualidad fundiéndose en una masa casi homogénea; resulta entonces difícil la distinción entre la orla bacilar y el resto del citoplasma. Después se forman gruesas gotas de secreción, que se pediculizan y caen en la luz del intestino, donde no tardan en fluidificarse según el proceso por todos bien conocido. Al final del proceso quedan las células desprovistas de su orla bacilar (lám. I, fig. *C*).

Las criptas epiteliales residen en esta especie al mismo nivel del

resto del epitelio, entre los pies de implantación del epitelio secretor. Están constituídas por células redondeadas de protoplasma muy claro y núcleo algo excéntrico. No he encontrado mitosis en estas células germinales.

Son abundantes en la luz intestinal las células de Leyding.

## Túnica conjuntivo-muscular.

Los elementos musculares del intestino medio en los Fásmidos han sido suficientemente descritos, por lo menos en sus grandes rasgos, por Bordas, Heymons, Sinéty y Cameron. Así es que no nos detendremos en su descripción. Unicamente, y como precedente imprescindible para la comprensión de lo que sigue, diremos que, como en el resto de los insectos, consta de dos capas; la interna está formada por fibras transversales y es continua en toda su extensión. En cambio la capa externa es de fibras longitudinales, pero en lugar de constituir una envoltura uniforme, las fibras se acumulan en delgados fascículos longitudinales, de modo que la mayor parte de la superficie del intestino está constituída en realidad por la capa transversal; es de notar que según demostró Sinéty, los cordones longitudinales confluyen entre sí por sus extremidades anterior y posterior y van a insertarse en los tegumentos.

A estas dos capas musculares ya conocidas hay que agregar otra extraordinariamente fina y constituída por fibras longitudinales que asientan por dentro de la capa transversal, entre ésta y el epitelio. Esta capa es de muy difícil observación y no me ha sido posible percibirla sino en cortes tangenciales del intestino. Una capa longitudinal interna semejante a ésta ha descrito Rengel en *Hydrophilus*.

Es de notar la escasez de los conocimientos actuales acerca de los elementos no musculares de la endopleura. No sólo en los grandes tratados generales, sino también en los trabajos monográficos, los autores que han estudiado la estructura del intestino describen minuciosamente la disposición de las fibras musculares, pasando por alto el resto de los elementos que constituyen esta capa, o a lo más indican la existencia de una membrana basal o de tal cual serosa peritoneal sin describirlas, y ya es sabido lo que tienen de imprecisos estos términos aplicados a los insectos.

Una verdadera membrana basal anhista separando el epitelio de la capa muscular ha sido encontrada en varios insectos; pero en otros casos, este nombre ha sido dado indebidamente a formaciones diversas situadas en inmediato contacto con el epitelio. En *Tenebrio molitor* y *Anabolia laevis* hay una basal anhista extraordinariamente fuerte, mientras que en *Malacosoma* falta por completo.

Deegener señala la existencia de células especiales propias de la endopleura, situadas entre el epitelio y la capa muscular; su significación morfológica y funcional nos es desconocida.

La existencia de una túnica serosa en los insectos es muy incierta, pues parece faltar en la mayoría de ellos. Rengel (1898) y Deegener (1900) encuentran en *Hydrophilus* una membrana anhista que envuelve por completo al tubo digestivo, separando la capa muscular de la cavidad del cuerpo; parece ser, aunque esto es inseguro, que esta membrana se formaría en los últimos estadios de la vida embrionaria por la coalescencia de células mesodérmicas, que después sufrirían una especie de hialinización con pérdida del núcleo y límites intercelulares. En *Cybister*, parece existir una formación semejante, pero incompletamente desarrollada. Russ (1908) señala también en *Anabolia* una membrana anucleada envolviendo completamente la capa muscular. Una estructura semejante encuentra MacDunnough (1909) en *Chrysopa*, pero situada entre los músculos longitudinales y transversales.

Estudiando mis preparaciones he podido observar la existencia de una complicadísima trama conjuntiva entre los elementos musculares de la endopleura, que paso a describir a continuación. Está constituída esta trama por una serie de membranas de aspecto endotelial, aunque no es posible por ahora decidir la presencia o ausencia de núcleos en su espesor. Son sumamente delgadas y se tiñen difusamente por la hematoxilina de Mayer, siendo notable el hecho de no quedar coloreadas por la hematoxilina férrica en las preparaciones debidamente diferenciadas; no se tiñen por los colorantes ácidos, especialmente con la fuchsina ácida. En las preparaciones efectuadas con los métodos corrientes ya hemos dicho que aparecen anhistas; en cambio las sales de plata revelan en ellas la existencia de fibrillas, que constituyen una verdadera trama conjuntiva.

En inmediato contacto con el epitelio aparece una de estas mem-

branas, que denominaremos subepitelial con objeto de no prejuzgar su naturaleza; esta es continua en toda su extensión y envuelve, a modo de un manguito, toda la capa epitelial. No podemos asimilar esta formación a una membrana basal por estar en continuidad material directa con otras membranas semejantes a ella por su estructura y que no están en contacto directo ni indirecto con elementos epiteliales. Tenemos la sospecha de que muchas de las basales descritas en los insectos son en realidad membranas de este tipo, es decir, de procedencia mesenquimatosa. Examinando la membrana subepitelial en preparaciones por delaminación o en cortes tangenciales, aparece surcada por múltiples y diminutos pliegues en sentido longitudinal. En ocasiones aparece esta membrana como constituída por dos hojillas concéntricas, adosada una a otra excepto a nivel de los pliegues, circunscribiéndose así pequeños conductos fusiformes en donde estarían alojados los elementos de la capa muscular longitudinal interna a que antes hicimos referencia; esto es particularmente apreciable en los cortes longitudinales, aunque debo advertir que es muy difícil apreciar si la membrana es sencilla o doble, dada la exigüidad de los elementos a observar.

Sea ello lo que sea, es lo cierto que de esta membrana fundamental se desprenden en sentido radial multitud de tabiques membranosos que atraviesan perpendicularmente todo el espesor de la capa muscular transversal. Estos tabiques se implantan siguiendo circunferencias cuyo plano es perpendicular al eje del intestino. Por consiguiente circunscriben en unión de la membrana subepitelial una serie de canales que rodean al intestino en sentido transversal y en los cuales van alojados los elementos musculares de la capa transversa.

Estos canales quedan cerrados, y por tanto convertidos en conductos, por una segunda membrana, la intermuscular, que envuelve toda la capa muscular transversal y que es concéntrica con la membrana subepitelial; como esta última, es continua en toda su extensión y en forma de manguito. Por fuera de ella van adosados los fascículos de la capa muscular, longitudinal cada uno de ellos, envuelto por una membrana semejante, al parecer, en su constitución a las anteriores.

No todos los conductos circulares comprendidos entre la membrana subepitelial y la intermuscular están ocupados por fibras muscula-

res. En el interior de algunos de ellos se encuentran células voluminosas dispuestas en fila transversal como el conducto que las alberga. Son de contornos perfectamente delimitados, de forma oval y con un protoplasma muy claro y sin granulaciones. No creo se trate de células conectivas, sino que me parecen homologables a las descritas por Deegener como elementos propios de la endopleura, y de los cuales, como ya hemos indicado, no se conoce su significación morfológica. Debo advertir que en este caso se encuentran en el mismo espesor de la capa muscular transversal y no entre ésta y el epitelio, como se ha observado en otros insectos; las filas de células alternan más o menos regularmente con las fibras musculares.

En realidad, el conjunto de membranas que acabo de describir constituye un todo único, un sistema en el cual todas sus partes están en continuidad material, y sólo las necesidades de la descripción me han obligado a considerar en él distintas porciones. Las vainas que envuelven los fascículos musculares longitudinales parecen ser más independientes, pues sólo entran en contacto con la membrana intermuscular en algunos puntos de su trayecto y en especial al nivel de las ramificaciones laterales que de vez en cuando emiten y que van a perderse en la capa transversal. Por otra parte, el sistema de membranas no parece ser exclusivo de la pared intestinal, pues más o menos simplificado se continúa con el revestimiento de los apéndices filiformes y quizá con el de los tubos de Malpighi.

Por medio de la tinción lenta con el carbonato de plata piridinado, según indicamos al comienzo de este trabajo, se evidencia que el sistema de membrana a que nos venimos refiriendo no es de estructura homogénea como parece en un principio. Aparecen en el espesor de las membranas gran cantidad de fibras conjuntivas fuertemente argentófilas. No parece tratarse de haces colágenos, primero por sus caracteres morfológicos y además por el hecho de no teñirse por los reactivos habituales. Son en cierto modo semejantes a las fibras de precolágena, o reticulina de los vertebrados. De todos modos, la verdadera naturaleza de estas fibras nos es desconocida, pues el método empleado puede teñir, según los casos e indistintamente, tanto la colágena como la reticulina y aun las fibras elásticas.

Se trata de filamentos de muy pequeño espesor, muy contorneados y de trayecto muy sinuoso. Se entrecruzan entre sí en direcciones

múltiples y constituyen de este modo un sólido armazón de las membranas que los contienen.

En las membranas subepidérmica e interepitelial las fibras son muy finas y llevan un curso predominantemente transversal, siguiendo la dirección de implantación de los tabiques radiales (lám. III, fig. *A*). En los cortes longitudinales del intestino se aprecia que las fibras conjuntivas se internan también por los tabiques radiales en sentido normal a la superficie del intestino, de modo que cada compartimiento de la capa transversal está completamente rodeado por un plexo de mallas estrechas (lám. I, fig. *C*). En las vainas que recubren los músculos longitudinales externos las fibras son más gruesas y más tortuosas y rodean por completo al haz muscular, dando imágenes semejantes a la reticulina que envuelve las fibras musculares lisas de los vertebrados, aunque, como puede apreciarse en la lámina III, figura *A*, en donde se ven tres de estos fascículos longitudinales, aquí son más gruesas las fibras conectivas.

Como puede verse por lo que llevamos expuesto, las formaciones intermusculares de la endopleura constituyen un complejo sistema que presenta ciertas analogías con los retículos endoteliales propios de los órganos hematopoyéticos de los vertebrados. Nótese además que, en realidad, la descripción que antecede es muy esquemática como corresponde al carácter que doy a este trabajo de nota preliminar, pues me propongo proseguir el estudio de este interesante sistema en otros trabajos más extensos. En efecto, por el resumen histórico que he expuesto a principio del capítulo, puede apreciarse que los conocimientos que hasta ahora se tenían de estas cuestiones eran muy incompletos. Creo que muchas de las basales descritas en diferentes insectos corresponden en realidad a la membrana subepitelial, y es seguro que las denominadas «serosas peritoneales» correspondan a la membrana intermuscular más las vainas membranosas de las fibras longitudinales. No por esto queda agotado el asunto ni mucho menos. Entre otras cosas falta por averiguar la naturaleza exacta de las formaciones membranosas; quizás se trate de un tejido endoteliforme más o menos transformado; nos es desconocida la composición química de estas membranas, así como la significación histológica de las fibras argentófilas en ellas contenidas. También es una cuestión a investigar las relaciones entre el sarcolema de las fibras musculares y las membranas

conjuntivas, así como la naturaleza exacta de las células propias de la endopleura, y, por fin, queda por comprobar la generalización de estas disposiciones en otros órganos de los insectos y en los distintos grupos taxonómicos que constituyen esta clase tan numerosa en especies. Me propongo estudiar estos asuntos en comunicaciones sucesivas.

## Apéndices filiformes.

Uno de los rasgos que llaman más la atención al disecar por primera vez el tubo digestivo de un Fásmido es la existencia de un gran número de pequeñas ampollas piriformes adosadas a la pared externa de de la mitad posterior del intestino medio; cada una de estas vesículas se continúa por un largo prolongamiento filiforme que flota en la pared del cuerpo; estos órganos son exclusivos de los Fásmidos, pues no han sido encontrados en otros insectos. Fueron descubiertos por Müller en 1825 y estudiados más tarde por Joly (1871) y Bordas en 1896, quien poco después (1898) dió algunos detalles de su morfología externa. Heymons (1897) homologa estos órganos a los tubos de Malpighi basado en consideraciones embriológicas y morfológicas, a pesar de estar situados en pleno intestino medio y aunque, según él, difieren por su papel fisiológico. Sinéty (1901) describe las relaciones de la musculatura longitudinal con la base de las ampollas, establece que son capaces de eliminar el azul de metileno lo mismo que los tubos de Malpighi e indica que las células epiteliales de la vesícula son plurinucleadas y provistas de una orla en cepillo semejante a la del epitelio intestinal. Posteriormente se ocupan del asunto Bordas (1906) y Cameron (1912); el primero describe muy sumariamente su estructura en el género *Phyllium*, describiendo las células de la ampolla como provistas de dos núcleos esféricos; el trabajo de Cameron no añade nada nuevo a lo ya conocido. Vemos, pues, que, aparte de las brevísimas líneas y defectuosos dibujos que Sinéty dedica al particular, la estructura de estos interesantes apéndices nos es casi desconocida; por esto procuraremos dar una descripción detallada de ellas.

Estos órganos se encuentran adosados a la pared de la porción más posterior del intestino medio en número de unos treinta. Se im-

plantan alineados en cuatro filas transversales, cada una de las cuales comprende unos seis o siete, estando equidistantes entre sí los de cada una de las filas. Las ampollas son piriformes, con una extremidad anterior redondeada y otra porterior que se atenúa progresivamente, continuándose con el largo filamento terminal. Puede verse un aspecto de conjunto de una de estas ampollas en la lámina I, figura *D*. Están en comunicación con el intestino por medio de un conducto excretor muy corto, que se abre en la cara interna de la ampolla. Por la extremidad anterior es abordada la glándula por un grueso tronco traqueal que se ramifica abundantemente en su superficie, y además por un fascículo muscular procedente de una ramificación colateral suministrada por uno de los músculos longitudinales vecinos; este manojo se extiende por la superficie del modo que luego veremos, y sirve para imprimir al conjunto del apéndice ciertos movimientos, que se observan perfectamente al hacer la disección de los mismos. El filamento terminal es cilíndrico, larguísimo y presenta un aspecto muy semejante al de los tubos de Malpighi, pero posee un diámetro equivalente a la tercera parte de los mismos. Su extremidad, que flota en el mesénquima de la cavidad del cuerpo, es cerrada en fondo de saco, como he podido comprobar por observación «in vivo».

El conducto excretor es sumamente corto, y según puede apreciarse en la lámina III, figura *D*, que representa una de estas vesículas en corte longitudinal con la porción de intestino adyacente, posee una estructura idéntica a la del mesénteron, por lo que no nos detendremos a describirla; únicamente diremos que el epitelio prismático inmediato a la glándula posee células más altas que de ordinario y que parecen obstruir en cierto modo la cavidad ampular.

El epitelio de las ampollas continúa el del conducto excretor, pasándose de éste a aquél por tránsito brusco. Sus células son enormemente más grandes que las del intestino y conducto excretor; vistas por la superficie externa de la glándula (lám. I, fig. *D*) son poligonales con límites intercelulares perfectamente marcados, ofreciendo el conjunto de la glándula el aspecto de un enlosado. En cortes longitudinales aparecen con un contorno rectangular, mucho más anchas que altas, por lo que en conjunto presenta una conformación tabular. En la cara que mira hacia la cavidad de la ampolla están provistas de una orla en cepillo o placa bacilar completamente análoga a la

del epitelio del mesénteron. El citoplasma es muy denso y fuertemente granuloso; presenta gran avidez por los colorantes básicos, tanto es así que no resulta empresa fácil obtener preparaciones bien diferenciadas, por teñirse casí con la misma intensidad que el núcleo; en las coloraciones regresivas tanto uno como otro se decoloran al mismo tiempo.

La forma del núcleo es muy característica; basta echar una ojeada a las figuras *A* y *B* de la lámina II para darse cuenta, mejor que por la descripción, del aspecto extraordinario que ofrece. Se trata de un núcleo abundantemente ramificado, con prolongaciones lobulares unidas unas a otras por pedículos a veces sumamente ténues, lo que puede dar la apariencia de célula polinuclear. Las distintas ramificaciones no siempre se extienden en un mismo plano, lo que contribuye más aún a dificultar la observación de los puentes de unión. No siempre se presentan los núcleos de esta manera; a veces se trata en realidad de núcleos múltiples, mientras que otras el núcleo es más o menos alargado, con una o varias constricciones que le dan aspecto arrosariado. No sé decir si estos diversos aspectos del núcleo se corresponden con los distintos estadios funcionales por los que atraviesan estas células. Lo cierto es que el núcleo ramificado sólo lo he encontrado en individuos adultos; en las larvas del 1.°, 3.° y aun 4.° estadio las células ampulares presentan uno o dos núcleos esféricos o elípticos como de ordinario.

Esta configuración ramificada del núcleo parece estar en relación con la función secretora de estas células. Es bien conocida la existencia de núcleos semejantes en las glándulas sericígenas del gusano de seda. Muy recientemente ha descrito Lozinsky fenómenos muy interesantes en la larva de *Myrmeleon;* los tubos de Malpighi, al llegar el animal a cierto grado de desarrollo, se transforman en glándulas secretoras de seda; pues bien, al principio muestran un epitelio con núcleos esféricos normales, pero al sobrevenir el cambio éstos expulsan una parte de su cromatina y se transforman en núcleos ramificados muy semejantes a los que nos ocupan. Todos estos hechos y la intensa basofilia del protoplasma parecen demostrar una intervención activa del núcleo en el proceso de la secreción, y además constituyen un argumento más para la homologación de estos órganos con tubos de Malpighi modificados, a despecho de su implantación en pleno intestino

medio. La diferencia entre el caso de *Myrmeleon* y los Fásmidos estribaría en que mientras en el primero el mismo tubo de Malpighi se transforma por entero en glándula sericígena, los apéndices filiformes de los Fásmidos serían tubos de Malpighi adaptados permanentemente a la nueva función, pero únicamente en su porción basal (ampolla), pues, como veremos, la porción filamentosa conserva casi intacto el aspecto y función de los verdaderos tubos de Malpighi. Esto estaría apoyado además por el hecho de que en los estadios más jóvenes del desarrollo postembrionario existe una diferenciación menos marcada entre las células de la ampolla y las del filamento, según hemos visto.

Las células ampulares presentan diferentes aspectos según la fase de la función secretora en que se encuentren (lám. II, figs. *C*, *D*, *E*), y esto lo mismo se refiere al contenido citoplásmico que a la orla bacilar; estos cambios son completamente semejantes a los que sufre el epitelio intestinal, y no los describimos por no caer en repeticiones inútiles. Nos es completamente desconocida la naturaleza del producto segregado; micrográficamente muestra grandes semejanzas con el elaborado por las células intestinales. Inmediatamente de ser expulsado se presenta con el aspecto de gotas o glóbulos muy basófilos que después se hinchan, perdiendo en parte su basofilia, y confluyen con otros glóbulos vecinos, terminando por constituir una masa amorfa que toma disposiciones varias, producto todas ellas de la coagulación efectuada por los reactivos fijadores; esta masa llena toda la cavidad de la ampolla y se vierte al intestino medio por el conducto excretor.

La endopleura del intestino se continúa por encima de la ampolla, a la que reviste en toda su extensión, pero sufre al mismo tiempo importantes modificaciones, que describiremos someramente (lám. III, fig. *D*). La capa muscular transversal del intestino desaparece al llegar a la unión del conducto excretor con la ampolla glandular; por consiguiente desaparecen también las membranas radiales, mientras que las membranas subepidérmica e intermuscular se adosan una a otra confundiéndose por completo. La vaina membranosa que envuelve la fibra procedente de la musculatura longitudinal y que aborda a la glándula por su polo anterior, se extiende abriéndose en forma de embudo y envolviendo por completo a la glándula; también se fusiona con las dos anteriores, constituyendo una sola membrana muy fina en la que no se distinguen sus elementos componentes.

Hemos dicho que la musculatura transversal se agota en el sitio en que la endopleura muscular pasa a endopleura ampular, y, no obstante, inmediatamente debajo de ésta se encuenta una finísima capa muscular cuyas fibras llevan una trayectoria transversa; estas fibras proceden en realidad del fascículo longitudinal que aborda a la glándula por su polo anterior. El estrato muscular es sumamente fino, pues está constituído por una sola capa de miofibrillas que se tiñen perfectamente por la hematoxilina ferruginosa; no debe extrañarnos esta disposición algo extraordinaria del tejido muscular, pues Lozinsky y otros han revelado estructuras semejantes en los tubos de Malpighi de diversos insectos.

El carbonato argéntico revela también en el espesor de las membranas que recubren la glándula un sistema de fibras argentófilas idénticas a las del intestino. Aquí, como se superponen las correspodientes a varias membranas, ofrecen el aspecto de un retículo inestricable en el que parecen distinguirse dos planos: uno interno, de fibras de dirección predominantemente transversal y que correspondería bien a la membrana subepidérmica, o bien a la intermuscular o a ambas a la vez, y otro externo, correspondiente a la vaina procedente de los músculos longitudinales, cuyas fibras llevan un curso más o menos oblicuo y predominantemente longitudinal (lám. III, fig. *C*).

El filamento terminal es sumamente largo, cilíndrico, y presenta una estructura idéntica a la de los tubos de Malpighi, por lo que no nos entretendremos en describirlo. Sus células presentan de ordinario dos núcleos esféricos, aunque en las situadas en la porción del tubo más próxima a la ampolla presentan frecuentemente un núcleo más o menos ramificado. Las membranas que envuelven la ampolla se continúan por la porción tubular, a la que revisten por completo, adelgazándose y tornándose casi imperceptibles.

También la plata revela en la superficie de estos tubos una rica trama conectiva constituída por fibras de dirección transversal al eje del tubo y cuyo aspecto puede observarse en la lámina III, figura *B*.

Para terminar, unas palabras sobre ciertos detalles observados incidentalmente en los tubos de Malpighi, que inducen a estrechar más las relaciones entre ellos y los apéndices filiformes. Desde hace mucho tiempo ha sido señalada en ellos una «túnica serosa» análoga a la que venimos describiendo y que yo creo continuación del sistema de mem-

branas que reviste al intestino. En ella he encontrado también un retículo argentófilo semejante en su disposición al de los tubos filiformes, aunque aquí las fibras conectivas son más finas y tan próximas unas a otras que dan la sensación de una membrana continua y fenestrada; estas fibras han sido encontradas por Leger y Duboscq en los Grílidos, quienes las califican de fibras elásticas; creo que la naturaleza de estas fibras debe ser objeto de investigaciones ulteriores.

Examinando *in vivo* en solución fisiológica los apéndices filiformes he encontrado en la luz de su porción tubular concreciones de uratos semejantes a las que se encuentran en los tubos de Malpighi, lo que viene a ser un argumento más para demostrar la similitud de funciones entre ambos.

## Conclusiones.

1.ª El empleo del líquido de Faure como medio de montaje de las preparaciones incluídas en gelatina y teñidas por la plata coloidal, presenta ventajas inapreciables, pues evita la enorme retracción que sufren los cortes al ser tratados por los reactivos deshidratantes.

2.ª Se estudian ciertos detalles morfológicos que constituyen una nueva prueba de que la «bordure en brosse» de las células epiteliales del intestino medio está constituída por bastoncitos inmóviles, simples dependencias del citoplasma periférico, que están cementados entre sí a beneficio de un cemento muy flúido.

3.ª La observación detenida de las diversas fases del proceso secretor de estas células pone de manifiesto que la cromatina nuclear participa activamente en él, indicándose también las modificaciones que sufre la orla bacilar.

4.ª Se hace un examen crítico de las membranas basales y túnicas serosas decritas por diversos autores y se pone de manifiesto un complicado sistema de membranas de aspecto endoteliforme, que constituyen el armazón de la endopleura del intestino medio. Estas membranas endoteliales envuelven también otros órganos, tales como los apéndices filiformes y los tubos de Malpighi.

5.ª La plata coloidal revela en el espesor de estas membranas una trama conjuntiva muy compleja, cuya exacta naturaleza se desco-

noce, constituyendo en conjunto algo semejante a un retículo-endotelio.

6.ª Se estudia detenidamente la estructura de los apéndices filiformes, hasta ahora casi desconocida, y en los que se distinguen dos porciones fundamentales: una basal en forma de ampolla, cuyas células epiteliales poseen un núcleo abundantemente ramificado y una orla en cepillo semejante a la del epitelio intestinal; esta porción posee una función secretora indudable. La segunda, en forma de tubo muy largo, es de constitución análoga a la de los tubos de Malpighi y comparte con ellos su función.

7.ª Tanto las dos porciones de los apéndices filiformes como los tubos de Malpighi están revestidos por membranas continuas endoteliformes, en cuyo seno existe un abundante retículo conectivo semejante al revelado en el intestino.

8.ª Se dan argumentos para demostrar la homología entre los tubos de Malpighi y los apéndices filiformes.

## Zusammenfassung.

Beim gründlichen Studium des Stäbchensaumes (bordure en brosse) der Mesenteron-Epithelzellen bei *Carausius morosus* Br. (Orth. Fasmidae) hat man Anzeichen gefunden, die zeigen, dass dieser Saum aus feinen, unbeweglichen, zylindrischen Stäbchen besteht, in sich befestigt durch eine klebrige Flüssigkeit, die die Trennung der einzelnen Stäbchen nicht zulässt, es sei denn, dass der Saum in seiner Dicke durch kleine Sekretionstropfen gestreift wird; ausserdem können verschiedene mechanische Einflüsse sie in Büscheln abtrennen und ihre ursprüngliche Richtung ändern, genau so, wie es bei einem feuchtem Pinsel im Wasser vorkommen kann. Der Stäbchensaum verändert sich homogen und intensiv acidophil in dem Gipfelpunkt der Sekretion, und schliesslich verschwindet er gänzlich, wenn dieselbe beendet ist. (Tafel I, Fig. *A*, *B*, und *C*.)

Das Kern-Chromathin erleidet Veränderungen in bestimmten Phasen der Sekretion; zuerst (Tafel I, Fig. *A* und *B*) zieht es sich zusammen an der höchsten Stelle der Zelle, und die Membran des Kerns wölbt sich leicht zu diesem Pol hin; wenn die Sekretion beendet

ist und der Stäbchensaum vollständig zerstört ist, dann verbreitet sich das Chromathin durch den ganzen Raum des Zellkerns (Tafel I, Fig. *C*).

Die Bindegewebe der Endopleura bei Insekten sind mehr oder weniger unbekannt. In Mesenteron von *C. morosus* habe ich ein Komplex-System von Membranen von endothelialem Aussehen gefunden, obgleich die Existenz von Zellkernen dort zweifelhaft ist. In der gewöhnlichen Technik erscheinen diese Membranen hyalin; sie sind homolog, aber nur zum Teil, in den Basal-Membranen und serosen Umhüllungen, die von einigen Autoren beschrieben worden sind. In dem Mesenteron von *Carausius* gibt es eine subepitheliale Membran, die unmittelbar den Mitteldarm umhüllt und ausserdem eine mit der ersteren konzentrische, die zwischen der Ringmuskelschicht und der Längsmuskelschicht liegt (Zwischenmuskelhaut); zwischen der einen und der anderen sind eine Reihe von radialen Membranen, die in Verbindung mitder ersteren einige Räume umschreiben in Querrichtung, in welchen sich die transversalen Muskelfasern befinden und die eigenen Zellen der Endopleura. Jedes Längsmuskelbündel ist eingekleidet in eine besondere Membranhülle. Durch die Silberkarbonat-Methode von Rio-Hortega wurde in dieser Membranen ein sehr kompliziertes System feiner Fasern entdeckt, das in seinem Aussehen dem Precolagena der Wirbeltiere ähnelt, obgleich wir noch nicht ihre wirkliche Natur kennen (Tafel I, Fig. *A*; Tafel III, Fig. *A*).

Ebenso ist noch die wirkliche histologische Bedeutung der Membranen zu ermitteln, sowie ihre Beziehungen zu der Sarkolemma des Muskelfasern des Darmes.

Die röhrenförmigen Anhänge des Mitteldarmes von *Carausius* bestehen aus einem basalen Teil, der birnenförmigen Blase, und einer langen Röhre, ähnlich den Malpighischen Gefässen. Der Blasenteil (Tafel I, Fig. *D*) besteht aus platten, sehr grossen Zellen, die im erwachsenen Stadium einen ausserordentlich verzweigten Kern besitzen (Tafel II, Fig. *A* und *B*); im Larvenstadium besitzen diese Zellen zwei kugelförmige Kerne.

Wir schreiben dem basalen Teil eine sekretorische Funktion zu; seine Zellen zeigen Sekretionsphasen, ähnlich denen des Epitheldarmes (Tafel II, Fig. *C, D* und *E*) und die Blase (Tafel III, Fig. *D*) ist angefüllt mit dem Sekretionsprodukt. Der Gefässteil spielt eine exkretori-

sche Rolle, genau so wie die Malpighischen Gefässe. Das ganze Organ ist umkleidet mit verschiedenen Membranhüllen, die mit der Darm-Endopleura zusammenhängen. In Diesen beobachtet man auch ein sehr kompliziertes Konnektivnetz (Tafel III, Fig. *B* und *C*). Der röhrenförmige Anhang stellt vom morphologischen Standpunkt aus die Malpighischen Gefässe dar, die ihren Basalteil in sekretorische Organe verwandelt haben, trotz ihrer Lage im Mitteldarm.

## Bibliografía.

BORDAS, L.

1896. Considérations générales sur l'appareil digestif des *Phasmidae*. *Bull. Mus. Paris.*

1898. L'appareil digestif des Orthopthères. *Ann. Sc. Nat.*, t. XV.

1906. Structure des coecums ou appendices filiformes de l'intestin moyen des Phyllies. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. CXLII.

CAMERON, M.

1912. Structure of the Alimentary Canal of the Stick-Insect'*Bacillus rossii* Fabr.; with a Note on the Parthenogenesis of this species. *Proc. Zool. Soc.* London.

DEEGENER, P.

1900. Entwicklung der Mundwerkzeuge und Darmkanals von *Hydrophilus*. *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, Bd. 68.

HEYMONS, R.

1897. Ueber die Organisation und Entwickelung von *Bacillus rossii* Fabr. *Sitz. Ber. Ak.*, Berlin.

LOZINSKY, P.

1922. Untersuchungen über die Histologie und Cytologie der Malpighischen Gefässe der Myrmeleonidenlarven. *Bull. intern. Acad. polon. Sc.*, ser. B. 1921. Cracow.

1922. Cytologische Untersuchungen über die Umwandlung der Malpighischen Gefässe der Myrmeleonidenlarven in Spinnendrüssen, etc. *Bull. intern. Acad. polon. Sc.*, ser. B. 1921. Cracow.

MCDUNNOUGH, J.

1909. Ueber den Bau des Darms und seiner Anhänge von *Chrysopa perla* L. *Arch. f. Naturgesch.*, Bd. 75.

Rengel, C.

1898. Ueber die periodische Abstossung und Neubildung des gesammten Mitteldarmepithels bei *Hydrophilus, Hydrous* und *Hydrobius. Zeitschr. f. wiss. Zool.,* Bd. 63.

Russ, E. L.

1908. Die postembryonale Entwicklung des Darmkanals bei den Trichopteren *(Anabolia laevis* Zett.). *Zool. Jahrb.*, Anat. 25.

Sinéty, R. de.

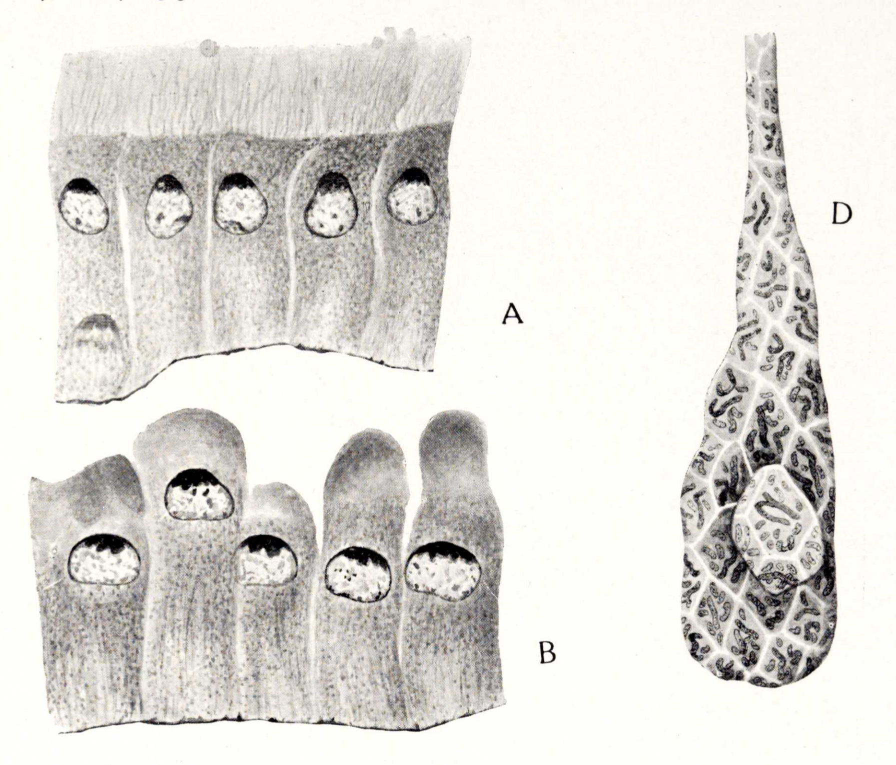
1901. Recherches sur la biologie et l'anatomie des Phasmes. *La Cellule,* t. xix.

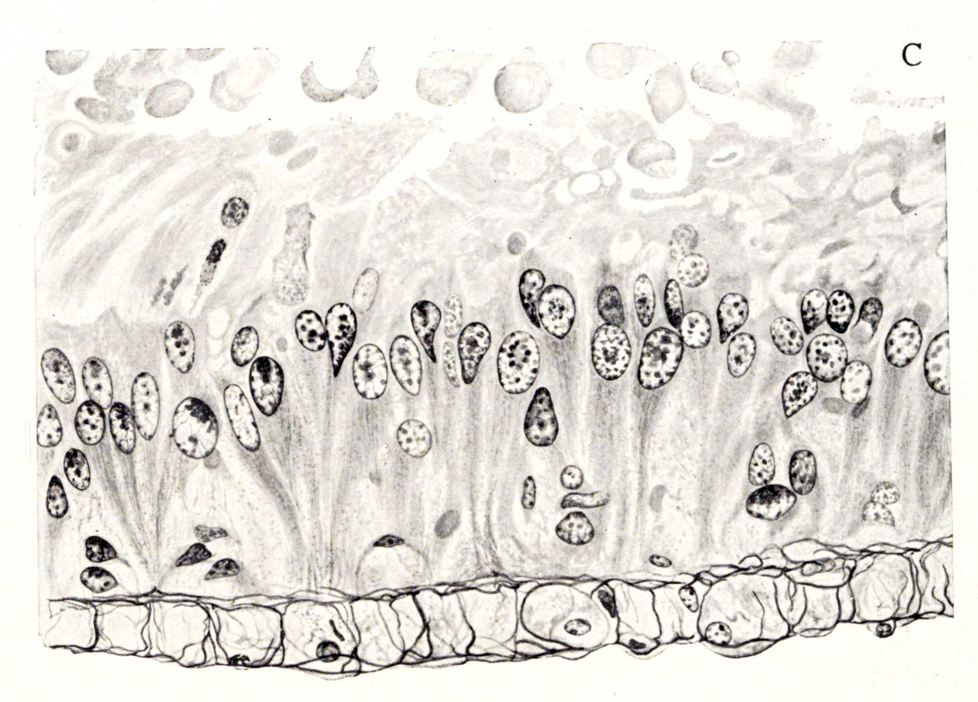
Vignon, P.

1900. Différentiations cytoplasmatiques. Cils vibratiles et cuticule. *Arch. Zool. exper. et gén.*

Laboratorio de Entomología
del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Lám. I.—**A** y **B,** corte longitudinal del epitelio del mesénteron; en **A,** estado de reposo; se observan algunos glóbulos pequeños entre los bastoncitos de la orla en cepillo; en **B** la fase excretora está en su período álgido; pérdida del aspecto estriado de la orla e intensa basofilia de la misma. Obsérvese en ambas figuras la disposición característica de la cromatina nuclear. **C,** coite longitudinal de la pared del intestino medio. La excreción del epitelio ha terminado, habiendo desaparecido la orla en cepillo; adviértase la disposición de la cromatina nuclear y las células de las criptas de regeneración; en la parte superior, el producto segregado en vías de disolución; en la inferior, la endopleura con su retículo conjuntivo, en el que se observan las membranas subepitelial e intermuscular además de las radiales; la musculatura transversal no está representada más que por algunos núcleos, pues el resto no está teñido. **D,** aspecto de conjunto de la porción ampular (basal) de un apéndice filiforme tal como aparecen en las preparaciones por delaminación; no han sido representados el tronco traqueal, las fibras musculares ni las membranas de revestimiento.

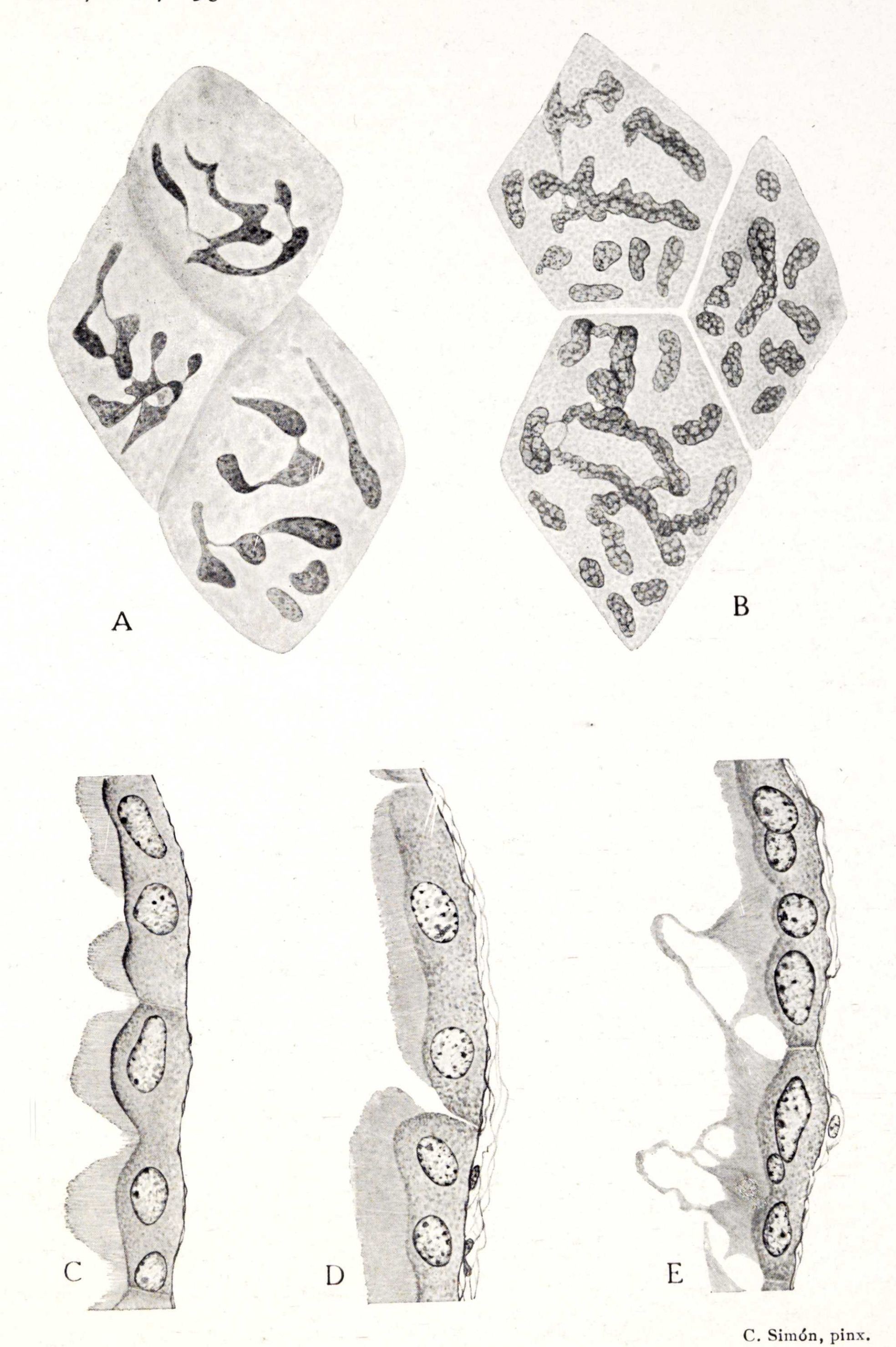



Ç. Simón, pinx.

F. Bonet: Sobre la estructura del mesénteron y sus apéndices tubuliformes en los Fásmidos.

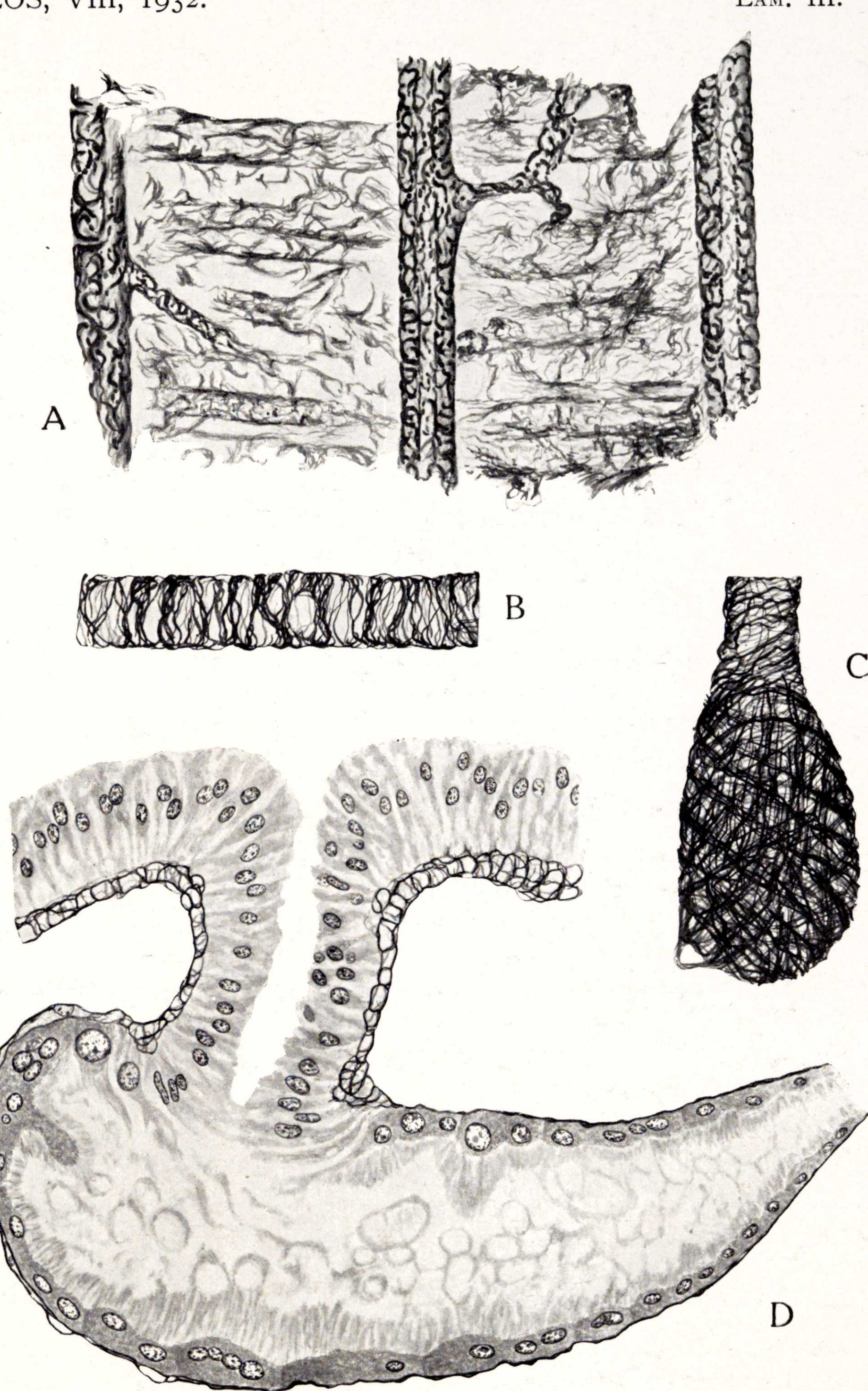
Lám. II.—**A** y **B**, células epiteliales de la ampolla basal de los apéndices filiformes vistas de plano. Preparación por delaminación; obsérvese la estructura ramificada del núcleo. **C**, **D** y **E**, las mismas células en corte longitudinal en diversas fases de su ciclo excretor; en **C** aparecen teñidos los corpúsculos basales confundidos en una línea obscura.




C. Simón, pinx.

F. BONET: Sobre la estructura del mesénteron y sus apéndices tubuliformes en los Fásmidos.

Lám. III.—**A,** corte tangencial de la pared intestinal teñida por la plata piridinada; pueden observarse tres fascículos musculares longitudinales de la capa externa, con la red de fibras conjuntivas que los envuelve; en segundo plano, fibras conjuntivas correspondientes a la membrana intermuscular. **B,** trozo de la porción tubular de un apéndice filiforme con su revestimiento conjuntivo. **C,** ampolla de un apéndice filiforme en la que se ha puesto en manifiesto la tupida trama conectiva que la envuelve; se aprecian los dos planos de fibras, unas longitudinales y otras oblicuo-transversales. **D,** corte longitudinal de una ampolla y de la porción de pared intestinal adyacente.




C. Simón, pinx

F. Bonet: Sobre la estructura del mesénteron y sus apéndices tubuliformes en los Fásmidos.